

B型肝炎患者リンパ球によるB型肝炎患者肝由来培養細胞に対する直接細胞障害能の検討

金沢大学医学部内科学第一講座 (主任: 服部 信教授)

鵜 浦 雅 志

(昭和56年3月20日受付)

Key words B型肝炎, KN細胞, 細胞障害性T細胞

B型肝炎における肝細胞破壊機序の詳細は現在のところ不明である。しかし、HBs抗原 healthy carrier の存在することから、B型肝炎ウィルス(以下HBVと略す)自体は、肝細胞に対する直接の細胞障害性は少ないと考えられている¹⁾²⁾。そのため、B型肝炎における肝細胞障害は、宿主側の反応、すなわち免疫反応によって生じているものと想定されている^{3)~5)}。

現在、いくつかのウィルス感染症において、ウィルス感染細胞破壊の主役は細胞障害性T細胞であることが証明されており⁶⁾、B型肝炎においても、細胞障害性T細胞出現の重要性が推測されている³⁾⁴⁾。しかし、細胞障害性T細胞はウィルス特異性を有する他、その活性を発揮するためには、標的細胞との間に主要組織適合抗原 Major histocompatibility (以下MHCと略す)の共有を必要とすることから⁷⁾、現在のところ適当な標的細胞が得られず、B型肝炎において、細胞障害性T細胞の出現は証明されていない。

著者は、Human leucocyte antigen (以下HLAと略す)A2,B40をもつHBs抗原陽性慢性肝炎患者より、針生検にて得られた肝組織由来の継代培養細胞を標的細胞として、HLAを判定の上、各種B型肝炎患者リンパ球による直接細胞障害能を検討し、この細胞障害に関与するeffector細胞が細胞障害性T細胞の特性を有しているか否かについて検討を行った。

対象および方法

対象

金沢大学第1内科に入院し、腹腔鏡・肝生検にて診断されたHBs抗原陽性慢性活動性肝炎(以下CAHと

略す)20例、HBs抗原陽性慢性非活動性肝炎(以下CIHと略す)5例、HBs抗原陽性肝硬変(以下LCと略す)4例、及び対照としてHBs抗原陰性健康者16例を用いて検討を行った。

方法

1 リンパ球の採取

ヘパリン加末梢血5mlより、Ficoll-Paque (Pharmacia社製)による比重遠心法⁸⁾にてリンパ球を分離し、Hanks'液(日水社製)にて3回洗浄後、5%胎児牛血清(以下FCSと略す)を含むDulbecco's modified Eagle's medium(日水社製)(以下DMEMと略す)に 6×10^6 個/mlあるいは 3×10^6 個/mlとなるよう調整した。

2 標的細胞

HLA抗原A2,B40を有するHBs抗原陽性慢性肝炎患者の肝組織に由来する培養細胞(以下KN細胞と略す)の80代台の細胞を用いた。

KN細胞は、1977年4月に金沢大学第一内科で針生検にて採取した肝組織より、東北大学細菌学教室にて株化された⁹⁾。5%牛血清を含むL-グルタミン添加イーグルMEM培地(日水社製)中で、約20時間のdoubling timeで良く増殖して単層を形成し、一部重層することもある(写真1)。軟寒天培地中では50%以上がコロニーを形成した。染色体数はモード54本であった。形態学的には電顕にてマイクロビリー、デスモゾーム、グリコーゲン様顆粒を認めた(写真2,3)。ウィルス粒子は確認されていない。産生タンパクについては、蛍光抗体法にて9代目の細胞に α -fetoprotein、アルブミンが確認されたが13代以降は認められ

Lymphocyte Cytotoxicity to Cultured Cells Originated from HBsAg-Positive Patient's Liver in HBsAg-Positive Liver Disease. Masashi Unoura, Department of Internal Medicine (I), (Director: Prof. N. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University.

ていない。酵素学的には、86代目の細胞を用いて、勝沼の方法¹⁰⁾でタイロシンアミノトランスフェラーゼ、オルニチンアミノトランスフェラーゼ活性を測定したが検出されなかった。以上よりKN細胞は、肝細胞由来であるが、現在肝細胞としての機能を示さない癌化した上皮系の培養細胞であると考えられる。また、渡辺らの報告では⁹⁾、KN細胞は蛍光抗体法ではHBs抗原、HBc抗原は検出されず、培養上清にもHBs抗原は検出されないが、sonication後3000rpm遠心上清には、逆受身血球凝集反応法（以下RPHA法と略す）で $2^1 \sim 2^2$ HBs抗原、 $2^1 \sim 2^3$ HBc抗原が検出され、HBs抗原陽性血清を接種すると4日目に抗HBs抗体で1.5%～12.5%の細胞が細胞質に（写真4）、抗HBc抗体で1.5%～18%の細胞が核あるいは核周辺部に蛍光抗体陽性となる。また、この感染細胞のsonication上清はRPHA法にて $2^4 \sim 2^6$ HBs抗原、 $2^3 \sim 2^6$ HBc抗原が検出されることから、HBVの存在は確認されないが、少なくともHBVに対する感受性を有する可能性があると報告している。

3 細胞障害試験

1×10^6 個のKN細胞が浮遊した10% FCS加Hanks'液0.5 mlに100 μ Ciの $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ を加え、37℃の条件下で培養、45分後にHanks'液にて3回洗浄し、最終的に5% FCS加D'MEMにKN細胞 1.5×10^5 個/mlとなるよう調整した。ヌンク社製96穴Uプレートの各ウェルに、 ^{51}Cr を標識したKN細胞浮遊液0.1 ml（KN細胞 1.5×10^4 個/well）を分注し、リンパ球と標的細胞の細胞数比が1:20, 1:40となるよう調整されたリンパ球浮遊液0.1 mlを加え、5% CO_2 , 95% air, 37℃の条件下で16時間静置培養後、各ウェルより培養上清0.1 mlを採取し、ウェルタイプガンマシンチレーションカウンターにて上清中の放射活性を測定した（図1）。

リンパ球による細胞障害能は% Lysisとして下記の式より算出した。

$$\% \text{ Lysis} = \frac{(\text{Experimental} - \text{Spontaneous}) \text{ count}}{(\text{Total} - \text{Spontaneous}) \text{ count}} \times 100$$

なお、total countとして、リンパ球浮遊液の代わりに、2.5%サロニン液0.1 mlを加えて標的細胞を全て破壊し、その上清0.1 ml中の放射活性を測定し、spontaneous countとして、リンパ球を含まない培養液のみを加えて、その上清0.1 ml中の放射活性を測定した¹¹⁾。

4 特異性の検討

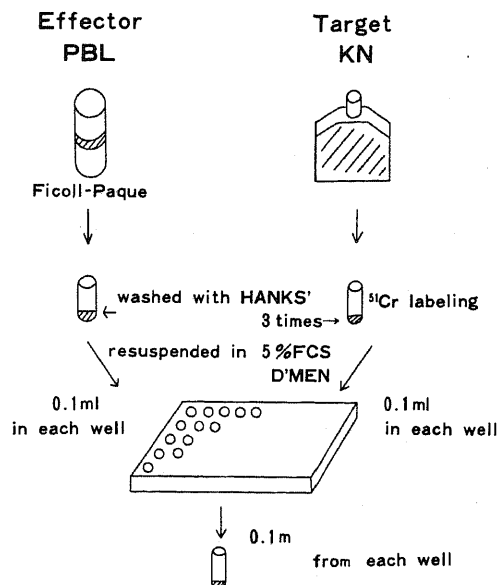


Fig. 1. Experimental procedure to assay the cytotoxicity of lymphocytes for KN cells.

標的細胞として、KN細胞の他に、ヒト横紋筋肉腫由来細胞(A204)、A204にBaEウィルスの持続感染した細胞(A204BaEV)、ヒト線維芽細胞をRSウィルスでtransformした細胞(RSa)を用いて細胞障害試験を行った。また、細胞障害阻止試験として、KN細胞に対する細胞障害試験開始時、標的細胞の10倍から80倍までの ^{51}Cr 非標識KN細胞、対照としてFL細胞を添加した。

5 Effector細胞の性格の検討

和光純薬製ナイロンウールを用いてリンパ球を分画し¹²⁾、T細胞濃縮リンパ球群、T細胞希釈リンパ球群として、各群の細胞障害能を検討した。また、T細胞処理を目的として、抗ヒト胎児胸腺血清（以下anti HETと略す）を30分間室温にてリンパ球と反応させ、Hanks'液にて洗浄後ウサギ補体を加え90分間処理を行い、処理後のリンパ球による細胞障害能を検討した。なお、anti HETは、7カ月胎児より得た胸腺を完全フロイド・アジュバンドと共に家兎に免疫し、得られた血清をヒトAB型赤血球、ヒト肝アセトン粉末、不溶化ヒト血清、B細胞慢性リンパ性白血病患者末梢血にて吸収し作製した。anti HETの特異性については、間接蛍光抗体法を用いた検討で、正常ヒト末梢血リンパ球の60%、ナイロンウールカラム通過リンパ球の100%がanti HETで蛍光陽性となることから、T細胞に対する特異性は高いと想定された¹³⁾。

6 HLA の判定

Falcon 社製マイクロテストプレートを用い Terasaki らの microcytotoxicity 法に従い¹⁴⁾, あらかじめ分注した抗血清に $1\mu\text{l}$ のリンパ球浮遊液を分注し, 45 分後ウサギ補体を $5\mu\text{l}$ 分注, 60 分間静置後 5 %エオジン液で染色し, 5 分後にホルマリンで固定し鏡検にてタイピングを行った. 使用した抗血清は 83 種である¹⁵⁾.

なお, 推計学的処理は χ^2 検定を用い, 危険率が 5 % 以下を有意とした.

成績

1 KN 細胞に対する細胞障害能について

標的細胞に対する effector 細胞数比 1 : 40 での各群における細胞障害能 (平均値 \pm 標準偏差) では, CAH 群 $28.2 \pm 9.3\%$, CIH 群 $22.3 \pm 4.0\%$, LC 群 $14.3 \pm 4.5\%$, 対照群 $18.1 \pm 5.4\%$ であり, CAH 群では対照群に比し高値を示し, その差は有意であった

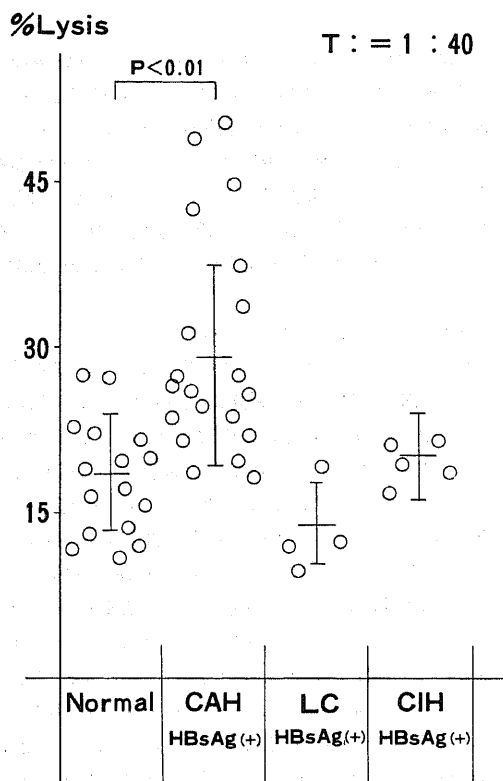


Fig. 2. Percent lymphocyte-mediated cytotoxicity against KN cells in normal controls and patients.

($p < 0.01$). 対照群に比し 2 ~ 3 倍高い細胞障害能を示したものは, CAH では 20 例中 4 例にみられたが, 他の群ではみられなかった (図 2).

細胞数比 1 : 40 では, 対照群, CAH 群のどちらにおいても, 細胞数比 1 : 20 に対して, 約 1.5 倍の細胞障害能を示し, この細胞障害はリンパ球数に依存性であった (図 3).

2 CAH, LC の細胞障害能と HLA

CAH, LC 症例のうち, HLA を検討したものは, CAH 9 例, LC 2 例である. 細胞障害能と HLA との関連について検討すると, 対照群の 2 ~ 3 倍の細胞障害能を示す CAH の症例 1 ~ 3 では, KN 細胞提供者のもつ HLA 抗原 A2, B40 のどちらかを有していた. しかし, CAH の症例 8, LC の症例 1, 2 では, KN 細胞提供者のもつ HLA との間に共有が認められたが, 細胞障害能は低値であった (表 1).

3 細胞障害能と培養時間

CAH の症例 1 のリンパ球を用いた, 細胞障害能と培養時間の関係を検討すると, 正常対照では, 培養開始後約 8 時間ではほぼ平衡に達したが, 患者リンパ球による細胞障害は 16 時間で平衡に達した (図 4).

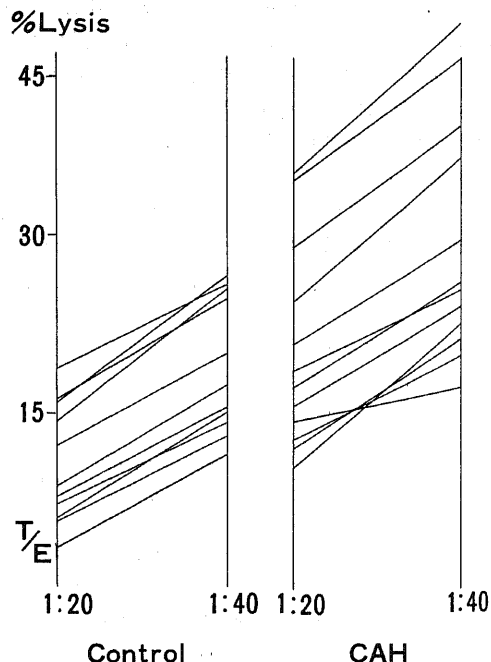


Fig. 3. Percent lymphocyte-mediated cytotoxicity against KN cells at T:E ratio of 1:20 and 1:40.

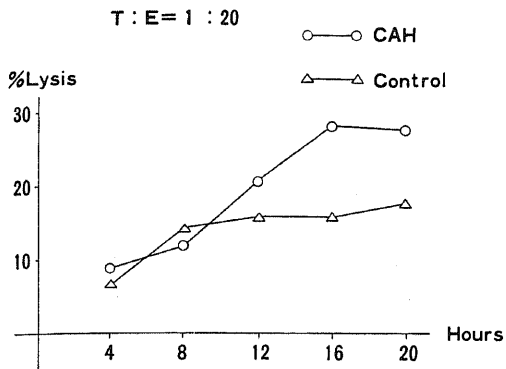


Fig. 4. Kinetics of lymphocyte-mediated cytotoxicity against KN cells.

Table 1. HLA phenotypes and percent lymphocyte-mediated cytotoxicity in patients.

CASE	HLA Phenotype	%Lysis
KN donor	A 2 B 40	
CAH 1	B 5 B 40	42.17
2	A 2 B 7	48.49
3	A 2 A 11	36.51
4	A 11 AW31 BW15 BW54	21.45
5	A 9	27.88
6	A 9 A 11 B 16	23.74
7	A 9 AW31 B 5 B 15	27.00
8	A 2 BW16 B 40	15.02
9	A 9 A 10 BW17	21.74
LC 1	A 2 AW31 BW16 B 40	13.71
2	A 9 AW31 B 7 B 40	12.32

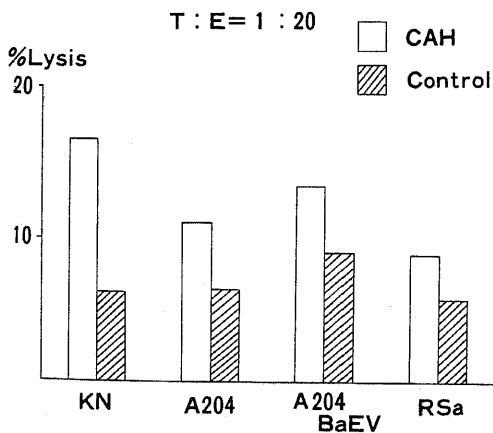


Fig. 5. Lymphocyte-mediated cytotoxicity against several cultured cells in a control and a patient with CAH.

4 細胞障害能の特異性の検討

標的細胞としてKN細胞の他に、A204, A204BaEV, RSa細胞を用いて、それぞれの標的細胞に対する細胞障害能を検討し、KN細胞に対する特異性があるか否かについて検討を行った。患者リンパ球は、いずれの細胞に対しても正常対照より高い細胞障害性を示したが、正常対照による細胞障害能との比で検討すると、A204, A204BaEV, RSaでは1.4～1.8倍であっ

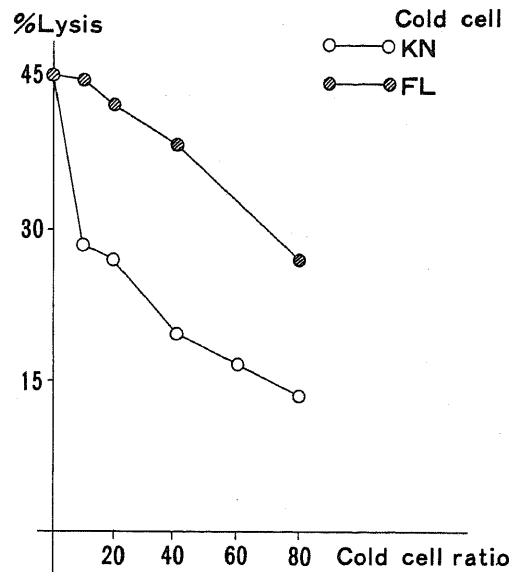


Fig. 6. Inhibition study by cold target cell competition of lymphocyte-mediated cytotoxicity in an HBsAg positive patient with CAH.

Table 2. The cytotoxic effect of each fraction of lymphocytes in an HBsAg positive patient with CAH.

Lymphocytes	%Lysis
Whole	30.4%
Nylon wool column	
passed	24.2%
adhesive	14.0%
passed + adhesive	24.4%

T : E = 1 : 20

たのに対し、KN細胞では、2.7倍の細胞障害性を示したことから、この細胞障害能は特異性を有する可能性が推測された(図5)。

また、KN細胞に対する細胞障害阻止試験開始時に、 ^{51}Cr 非標識のKN細胞、対照としてFL細胞を添加して細胞障害阻止試験を行ったところ、FL細胞の添加による細胞障害能の低下は軽度であったが、標的細胞と同一のKN細胞を添加すると、その細胞障害能は著明に低下した。この結果からも、この細胞障害能は特異性を有する可能性が推測された(図6)。

5 effector 細胞の性格の検討

ナイロンウールカラムを用いて effector 細胞を分画すると、ナイロンウール通過細胞群の表面免疫グロブリン陽性細胞は5%以下であり、通過細胞群はT細胞群であると考えられた。各分画の細胞障害能を検討すると、ナイロンウール通過細胞群は最も強い細胞障害性を示し、この細胞障害を担当するリンパ球はT細胞である可能性が推測された(表2)。

一方、T細胞処理を目的として、リンパ球を anti HET とウサギ補体とで処理すると、リンパ球の約40%に死細胞を認め、羊赤血球とロゼットを形成するリンパ球は15%以下に減少した。また、これらの anti HET と補体で処理した後のリンパ球群による細胞障害能は著明に低下した。この成績からも、この細胞障害を担当するリンパ球はT細胞である可能性が推測された(表3)。

考 察

現在知られているウィルス感染細胞に対する免疫反

Table 3. Percent lymphocyte-mediated cytotoxicity treated with anti HET and rabbit complements against KN cells in an HBsAg positive patient with CAH.

Treatment	%Lysis
None	31.5%
anti HET + C	12.0%
anti HET alone	24.2%
C alone	22.0%

T : E = 1 : 20

C : complement

応には、抗体と補体による反応¹⁶⁾、免疫複合体による反応¹⁷⁾、細胞障害性T細胞による反応^{18)~20)}、マクロファージによる反応²⁰⁾、抗体とリンパ球による antibody dependent cell mediated cytotoxicity(以下 ADCC と略す)²⁰⁾²¹⁾、などがあり、最近 spontaneous cell mediated cytotoxicity(以下 S - CMC と略す)と呼ばれる反応も注目されている²²⁾。一方、HBV 感染肝細胞障害に関与する免疫反応としては、肝細胞膜に対する抗体の存在²³⁾²⁴⁾、肝組織中の免疫複合体の存在²⁵⁾、各種の標的細胞に対するリンパ球の細胞障害能の変化^{24)~40)}、ADCC 活性の変化²⁸⁾²⁹⁾³⁴⁾³⁵⁾などが報告されている。しかし、B型肝炎における肝細胞障害性に働く免疫反応の主役は、現在のところ不明である。

ウィルス感染症のなかで、免疫反応の主役が明らかにされている代表的疾患は、マウスでの lymphocytic choriomeningitis ウィルス感染症である。この感染症では、ウィルス自体は細胞障害性を示さないにもかかわらず、生体の免疫機構は、その感染細胞を異物として認識して細胞障害性を発揮し、ついには生体自身を死に至らしめることがあり、このときの免疫反応の主役は抗原特異的細胞障害性T細胞であることが証明されている⁶⁾⁴²⁾。この Doherty らおよび Gilden らの成績と今回の研究成果から、著者はB型肝炎においても細胞障害性T細胞はHBV感染肝細胞破壊に重要な役割を演じていると考えている(図7)。

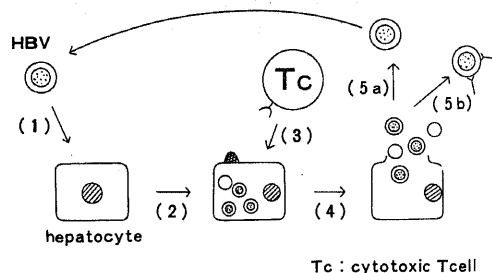


Fig. 7. Schematic illustration of the hypothesized role of an immune response in the pathogenesis of HBV associated liver disease.

- (1) HBV infection.
- (2) Expression of HBV associated antigens on the hepatocyte membrane.
- (3) Induction of cytotoxic T cells specific for HBV infected cells.
- (4) Cytolysis of HBV infected cells by cytotoxic T cells specific for HBV infected cells.
- (5a) HBV reinfection.
- (5b) Neutralization of HBV by antiHBs.

近年、ヒトにおいても、細胞障害性 T 細胞は、ウィルス特異性を有する他に、その活性を発揮するためには、標的細胞との間に MHC (ヒトでは HLA) の一部を共有する必要があることが示されている⁴³⁾⁴⁴⁾。したがって、これまでの Chang 肝細胞^{27)~29)32)33)} Coon 肝細胞³¹⁾ 家兎肝細胞²⁶⁾ ヒト胎児肝細胞²⁹⁾ を標的細胞とした患者リンパ球による細胞障害能の検討では、細胞障害性 T 細胞のもつ特徴から、HBV 特異的細胞障害性 T 細胞の評価は困難と思われる。事実、これらの標的細胞に対して障害性に働く免疫反応は S - CMC あるいは ADCC であると考えられている。細胞障害性を示す免疫反応は T 細胞ではないかとする報告は、HBs 抗原を種々の細胞に被覆した実験系によって検討されている。Alberti らは³⁴⁾ ひな鳥の赤血球に、Elsheikh らは³⁵⁾ 家兎赤血球に、Warnatz らは³⁶⁾ Chang 肝細胞に HBs 抗原を被覆し、これを標的細胞として検討し、Alberti らは急性 B 型肝炎に高い細胞障害性を示す症例を多く認め、B 型 CAH には細胞障害性を示す症例は少なかったとしているが、後 2 者は B 型 CAH にも高い細胞障害性を認めている。3 者とも effector 細胞は T 細胞であり、HBs 抗原に対して特異性を有していたとしているが、細胞障害性 T 細胞のもつ MHC の共有を必要とする特徴から、この effector 細胞は細胞障害性 T 細胞であるとの確認はなされていない。一方、自己肝細胞を標的細胞とする実験系では、細胞障害性 T 細胞の活性を評価することは可能と思われる。Paronetto らは³⁷⁾ 短期間培養自己肝細胞を標的細胞として検討し、B 型 CAH の 5 例中 4 例に、非 B 型 CAH の 5 例中 4 例に、また、Wand ら³⁸⁾ Geubel らは³⁹⁾ 生検肝細胞を直接標的細胞として細胞障害試験を行い、前者は 6 例の HBs 抗原陽性例を含む 9 例全例の CAH に、後者は CAH の 25 例中 13 例、HBs 抗原陽性例に限れば 7 例中 1 例の CAH 患者に強い細胞障害性を認めているが、いずれも、effector 細胞の検討、特異性の検討は行われていない。一方、Vergani らは⁴⁰⁾ 同様に生検肝細胞を標的細胞として用い、effector 細胞の検討を加え、16 例中 10 例の CAH に高い細胞障害性を認め、その細胞障害性は非 T 細胞群に強く、ADCC が関与しているのではないかと述べているが、HBs 抗原陽性例は対象に含まれていない。

このように、現在のところ、B 型肝炎では HBV 感染肝細胞破壊に T 細胞が関与している可能性は推測されているが、特異的に障害性を発揮する細胞障害性 T 細胞の存在は充分には証明されていない。今回著者の KN 細胞を標的細胞とする細胞障害試験の成績では、HBs 抗原陽性 CAH 群は対照群に比し有意に高い細胞

障害性を示しており、また、この CAH 群のなかには特に強い細胞障害性を発揮する症例が認められた。標的細胞として用いた KN 細胞は、HBs 抗原陽性者の肝組織に由来し、HBV 感染に対し感受性を示すことより、KN 細胞は HBV によって修飾された表面抗原を有している可能性が推測されることから、著者はこの特に強い細胞障害性を発揮しているリンパ球は細胞障害性 T 細胞ではないかと考え、これらの CAH 症例において KN 細胞に対して障害性に働くリンパ球の性格の検討を行った。強い細胞障害性を示す CAH 症例では、KN 細胞提供者との間に HLA の共有を認め、このなかの 1 例で、その effector 細胞は T 細胞に属し、さらに、その細胞障害性には特異性の存在が推測されることより、この細胞障害性を示すリンパ球は、抗原特異的細胞障害性 T 細胞である可能性が推測された。この症例には輸血歴はなく、いわゆる alloreactive T 細胞¹⁹⁾ である可能性は少ないと考えており、KN 細胞の由来、性状から HBV に関連した抗原を認識している可能性が推測される。しかし、現在のところ、KN 細胞の表面抗原については検索されておらず、今後さらにこの点についての検討が必要と考えている。また HLA 抗原の共有を認めながら細胞障害能が低値を示した症例では、各種の肝疾患で認められている血清中に存在するリンパ球による細胞障害能抑制因子²⁷⁾³⁹⁾⁴⁵⁾⁴⁶⁾、抑制性 T 細胞⁴⁷⁾、さらには肝疾患の病態やリンパ球膜の脆弱性の存在⁴⁸⁾ の可能性も推測されるがさらに検討が必要と思われる。

結 論

HLA 抗原 A2, B40 を有する HBs 抗原陽性慢性肝炎患者肝由来培養細胞 (KN 細胞) を標的細胞として、HBs 抗原陽性肝炎患者者リンパ球による細胞障害試験を行い以下の成績を得た。

1 HBs 抗原陽性慢性活動性肝炎患者群は、正常対照に比し有意に高い細胞障害能を示した ($p < 0.01$)。

2 正常対照の 2~3 倍の細胞障害性を示した症例では、KN 細胞提供者との間に HLA の共有が認められた。

3 高い細胞障害能を示した HBs 抗原陽性慢性活動性肝炎の 1 例で、細胞障害阻止試験により、この細胞障害性に特異性が存在する可能性が推測された。また effector 細胞は、ナイロンウールカラム通過性で、抗ヒト胎児胸腺血清と補体処理にて、その細胞障害能は著明に減弱したことからこの細胞障害性に働いている細胞は、細胞障害性 T 細胞である可能性が推測された。

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜りました服部信教授に深甚なる謝意を捧げますと共に直接御指導いただいた小林健一助教授、加登康洋博士、西邨啓吾博士、熊谷幹男博士に深謝致します。また、KN細胞の樹立、性状の検討を下さった東北大学細菌学教室各位、徳島大学酵素化学部勝沼信彦教授他各位、また、anti HETの作製をはじめ免疫学的御指導をいただいた千葉大学免疫研究部各位、実験施設の提供および御指導いただいた金沢大学がん研究所ウィルス部波田野基一教授他各位に深謝致します。

なお本論文の要旨は、第9回日本免疫学会総会(1979)において発表した。

文 献

- 1) Hadziyannis, S., Vissoulis, C., Moussourous, A. & Afroudakis, A. : Cytoplasmic localization of Australia antigen in the liver. *Lancet*, I, 976 - 979 (1972).
- 2) Furuta, S., Kiyosawa, K., Nagata, Y. & ODA, M. : HBsAg on cell membrane in symptom-free carrier. *Lancet*, II, 227 (1975).
- 3) Eddleston, A. L. W. F. & Williams, R. : Inadequate antibody response to HBsAg or suppressor T-cell defect in the development of active chronic hepatitis. *Lancet*, II, 1543 - 1545 (1974).
- 4) Dudley, F. J., Giustino, V. & Sherlock, S. : Cell-mediated immunity in patients positive for hepatitis-associated antigen. *Brit. Med. J.*, iv, 754 - 756 (1972).
- 5) Williams, R. & Eddleston, A. L. W. F. : Chronic active hepatitis : immunopathogenesis and immunotherapy. *Israel J. Med. Sci.*, 15, 261 - 275 (1979).
- 6) Doherty, P. C. & Zinkernagel, R. M. : T-cell-mediated immunopathology in viral infections. *Transplant. Rev.*, 19, 89 - 120 (1974).
- 7) Zinkernagel, R. M. & Doherty, P. C. : Restriction of in vitro T-cell mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semi-allogeneic system. *Nature*, 248, 701 - 702 (1974).
- 8) 辻公美 : 比重遠心法によるリンパ球の分離. 免疫実験操作法(I), 日本免疫学会編, 265 - 268 (1971).
- 9) 渡辺雅保, 太田まき子, 大堀均, 石田名香雄 : B型肝炎患者の肝組織から樹立した株細胞(KN)の性状. 第27回日本ウィルス学会演説抄録, 141 (1979).
- 10) Kido, H., Sanada, Y., Katunuma, N. & Morris, H. : Establishment of a clonal strain of hepatoma cells derived from Morris hepatoma 8999. *Gann*, 68, 691 - 696 (1977).
- 11) Yamauchi, K., Fujimoto, S. & Tada, T. : Differential activation of cytotoxic and suppressor T cells against syngenic tumors in the mouse. *J. Immunol.*, 123, 1653 - 1658 (1979).
- 12) 栗林景容, 高林有道, 増田徹 : Nylon wool columnによるマウスT細胞の濃縮. 免疫実験操作法V, 日本免疫学会編, 1461 - 1464 (1976).
- 13) 加登康洋, 林哲二, 西邨啓吾, 小林健一, 服部信 : 肝組織内リンパ球の解析. *クリニカ*, 6, 30 - 34 (1979).
- 14) Terasaki, P. I. & McClelland, J. D. : Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 204, 998 - 1000 (1964).
- 15) 熊谷幹男 : 遺伝体質および細胞性免疫面よりみた asymptomatic HBsAg carrier の成立機序について. *肝臓*, 20, 339 - 345 (1979).
- 16) Allison, A. C. : Interactions of antibodies, complement component and various cell types in immunity against viruses and pyogenic bacteria. *Transplant. Rev.*, 19, 3 - 55 (1974).
- 17) Oldstone, M. B. A. & Dixon, F. J. : Immune complex disease in chronic viral infection. *J. Exp. Med.*, 134, 32s - 40s (1971).
- 18) Cerottini, J. C., Nordin, A. A. & Brunner, K. T. : Cellular and humoral response to transplantation antigens. *J. Exp. Med.*, 134, 553 - 564 (1971).
- 19) Sondel, P. M., Chess, L., MacDermott, R. P. & Schlossman, S. F. : in vivo specific allogeneic lympholysis mediated by human T cells alone. *J. Immunol.*, 114, 982 - 987 (1975).
- 20) Cerottini, J. C. & Brunner, K. T. : Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection, and tumor immunity. *Adv. Immunol.*, 18, 67 - 132 (1974).
- 21) Shore, S. L., Nahmias, A. J. & Starr, S. E. : Detection of cell-dependent cytotoxic antibody to cells infected with herpes simplex virus. *Nature*, 251, 350 - 352 (1974).
- 22) Pross, H. F. & Jondal, M. : Cytotoxic lymphocytes from normal donors : a functional maker of human non-T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 21, 226 - 235 (1975).
- 23) Hopf, U., Meyer zum Bushenfelde, K. H. &

- Arnold, W.: Detection of a liver-membrane auto-antibody in HBsAg-negative chronic active hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, **294**, 578-582 (1976).
- 24) Jensen, D. M., MacFarlane, I. G., Portmann, B. S., Eddleston, A. L. W. F. & Williams, R.: Detection of antibodies directed against a liver-specific membrane lipoprotein in patients with acute and chronic active hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, **299**, 1-7 (1978).
- 25) Almeida, J. D. & Waterson, A. P.: Immune complexes in hepatitis. *Lancet*, **ii**, 983-986 (1969).
- 26) Tomson, A. D., Cochrane, M. A. G., MacFarlane, I. G., Eddleston, A. L. W. F. & Williams, R.: Lymphocyte cytotoxicity to isolated hepatocytes in chronic active hepatitis. *Nature*, **252**, 721-722 (1974).
- 27) Wands, J. R., Perrotto, J. L., Alpert, E. & Isselbacher, K. J.: Cell-mediated immunity in acute and chronic hepatitis. *J. Clin. Invest.*, **55**, 921-929 (1975).
- 28) Vierling, J. M., Nelson, D. L., Strober, W., Bundy, B. M. & Jones, E. A.: In vitro cell-mediated cytotoxicity in primary biliary cirrhosis and chronic hepatitis: dysfunction of spontaneous cell mediated cytotoxicity in primary biliary cirrhosis. *J. Clin. Invest.*, **60**, 1116-1128 (1977).
- 29) Warnatz, H., Gutmann, W., Rosch, W. & Hommel, G.: Studies on lymphocytotoxicity in acute and chronic liver disease. *Z. Immun. Forsch.* **153**, 435-449 (1977).
- 30) Cochrane, A. M. G., Tsantoule, D. C., Moussouros, A., MacFarlane, I. G., Eddleston, A. L. W. F. & Williams, R.: Lymphocyte cytotoxicity for kidney cells in the renal tubular acidosis of autoimmune liver disease. *Gut*, **16**, 828 (1987).
- 31) 新谷寿久, 野々村昭孝, 太田五六: 慢性活動性肝炎患者のEAロゼット形成リンパ球の肝細胞障害能について. *日消誌*, **75**, 174-179 (1978).
- 32) 原建樹, 各務伸一, 坂本信夫, 服部武, 加藤陽一郎: 慢性肝炎患者の末梢血リンパ球およびそのseparated lymphocyteのchang肝細胞に対する細胞障害性の検討. *肝臓*, **18**, 289 (1977).
- 33) 森実敏夫, 渡辺哲, 土本寛二, 小野明, 土屋雅春: 慢性肝疾患および原発性肝癌患者における末梢血リンパ球の細胞障害性. *消化器と免疫*, **1**, 103-109 (1977).
- 34) Alberti, A., Realdi, G., Bortolotti, F. & Rigoli, A. M.: T-lymphocyte to HBsAg-coated target cells in hepatitis B virus infection. *Gut*, **18**, 1004-1009 (1977).
- 35) Elsheikh, N., Osman, C. G., Cullens, H., Eddleston, A. L. W. F. & Williams, R.: T lymphocyte-mediated cytotoxicity in HBsAg-positive liver disease. *Clin. Exp. Immunol.*, **31**, 158-165 (1978).
- 36) Warnatz, H., Rosch, W., Gerlich, W. & Gutmann, W.: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and cell-mediated cytotoxicity (CMC) to HBsAg-coated target cells in patients with hepatitis B and chronic hepatitis (CAH). *Clin. Exp. Immunol.* **35**, 133-140 (1979).
- 37) Paronetto, F. & Vernace, S.: Immunological studies in patients with chronic active hepatitis: cytotoxic activity of lymphocytes to autochthonous liver cells grown in tissue culture. *Clin. Exp. Immunol.*, **19**, 99-104 (1975).
- 38) Wands, J. R. & Isselbacher, J.: Lymphocyte cytotoxicity to autologous liver cells in chronic active hepatitis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 1301-1303 (1975).
- 39) Geubel, A. P., Keller, R. H., Summerskill, W. H. J., Dickson, E. R., Tomasi, T. B. & Shorter, R. G.: lymphocyte cytotoxicity and inhibition studied with autologous liver cells: observations in chronic active liver disease and the primary biliary cirrhosis syndrome. *Gastroenterology*, **71**, 450-456 (1976).
- 40) Vergani, G. M., Jenkins, P. J., Portmann, B., Mowat, A. P., Eddleston, A. L. W. F. & Williams, R.: Lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in HBsAg-negative chronic active hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.*, **38**, 16-21 (1979).
- 41) Bortolotti, F., Realdi, G., Diodati, G. & Fattovich, G.: antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in acute hepatitis B and in chronic active hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.*, **33**, 211-216 (1978).
- 42) Gilden, G. H., Cole, G. A. & Nathanson, N.:

Immunopathogenesis of acute central nervous system disease produced by lymphocytic choriomeningitis virus : ii adoptive immunization of virus carriers. *J. Exp. Med.*, **135**, 874 - 889 (1972).

43) Dickmeiss, E., Soeberg, B. & Svejgard, A. : Human cell-mediated cytotoxicity against modified target cells is restricted by HLA. *Nature*, **270**, 526 - 528 (1977).

44) McMichael, A. J. & Askonas, B. A. : Influenza virus specific cytotoxic T Cells in man : induction and properties of the cytotoxic cell. *Eur. J. Immunol.*, **8**, 705 - 711 (1978).

45) Keller, R. H., Summerskill, W. H. J., Geubel, A. P. Shorter, R. G. & Tomasi, T. B. : Alfa fetoprotein and suppression of cell mediated

immunity in chronic active liver disease. *Gastroenterology*, **70**, 901 (1976).

46) Kakumu, S., Hara, T., Gohji, H. & Sakamoto, N. : Inhibition of lymphocyte cytotoxicity in chronic active hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.* **33**, 71 - 78 (1978).

47) Fujimoto, S., Matsuzawa, T., Nakagawa, K. & Tada, T. : Cellular interaction between cytotoxic and suppressor T cells against syngeneic tumor in the mouse. *Cell. Immunol.*, **38**, 378 - 387 (1978).

38) 安藤喬, 吉田洋, 寺倉俊勝, 深沢俊男, 高橋善弥太: 肝胆道疾患における赤血球浸透圧抵抗. *日消誌*, **74**, 329 - 339 (1977).

Lymphocyte Cytotoxicity to Cultured Cells Originated from HBsAg-Positive Patient's Liver in HBsAg-Positive Liver Disease Masashi Unoura, Department of Internal Medicine (I) (Director: Prof. N. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Jusen Med. Soc., 90, 352—363 (1981)

Abstract

A cell line (KN) originated from the liver of a HBsAg-positive patient with chronic active hepatitis was established. HLA types of the donor were A2, B40. The cytotoxicity of lymphocytes from patients with HBsAg-positive CAH, CIH, LC and normal controls was studied using ^{51}Cr labeled KN as target cells.

It was found that (a) lymphocytes from patients with CAH were cytotoxic to KN compared with controls ($p < 0.01$); (b) patients with CAH who showed two to threefold cytotoxicities and the donor of KN-shared HLA antigens; (c) specificity of cytotoxic reaction to target cells was suggested by competitive inhibition study in one of those patients; (d) lymphocytes treated with rabbit antiserum to human embryonic thymocytes and complement showed one-third cytotoxicity compared with non-treated lymphocytes in this patient.

The results suggested that lymphocytes from a patient with CAH were highly cytotoxic to KN cells and the principle effector cells were cytotoxic T cells.

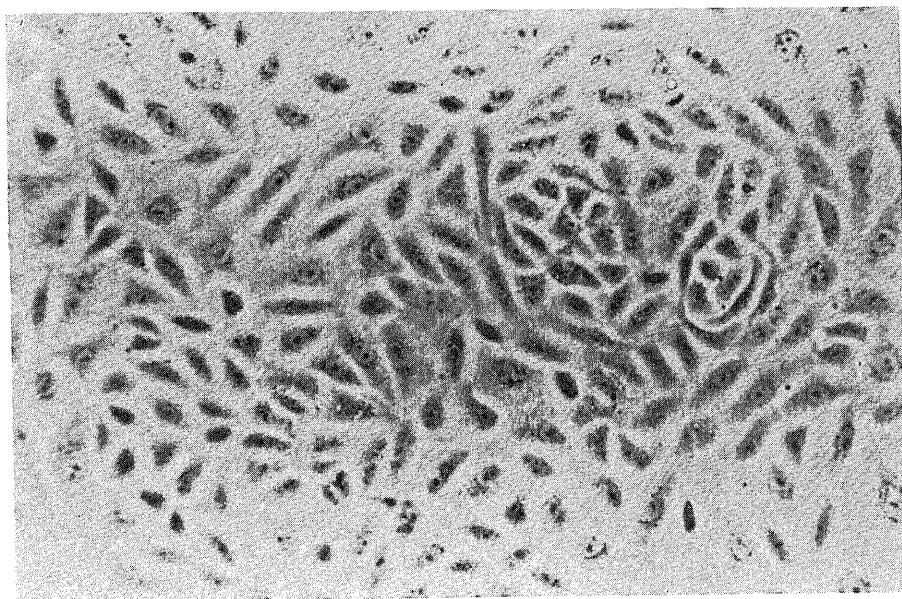


写真1 Micrograph of KN cells

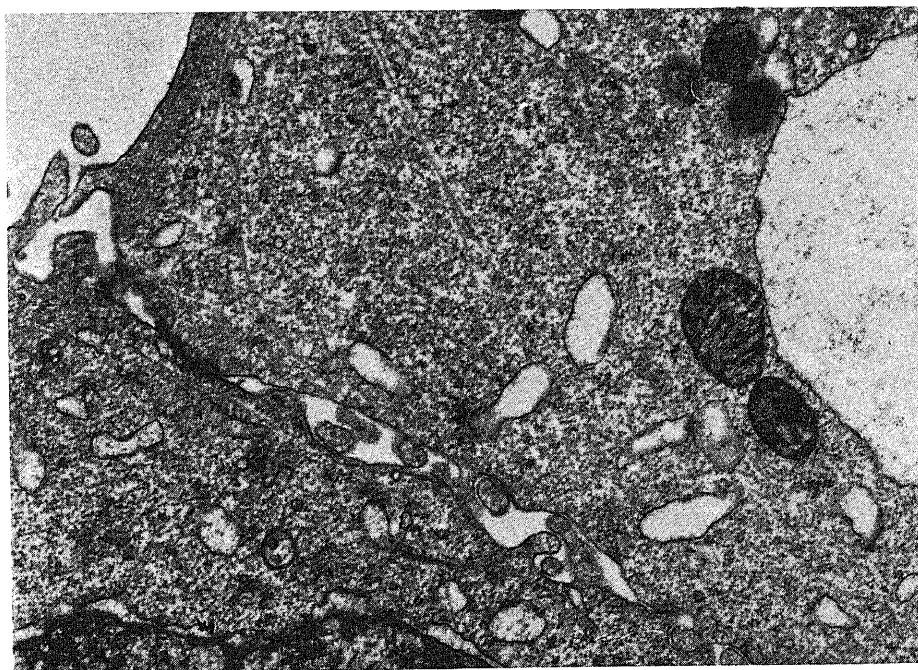


写真2 Electron micrograph of KN cell. (1) $\times 20,000$

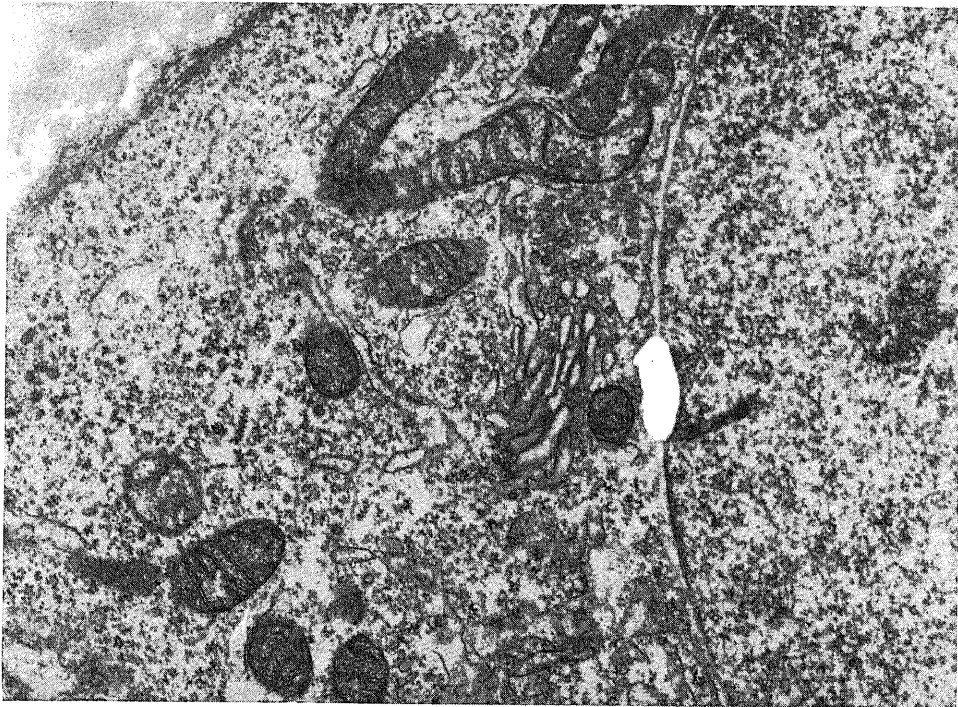


写真3 Electron micrograph of KN cell. (2) $\times 20,000$

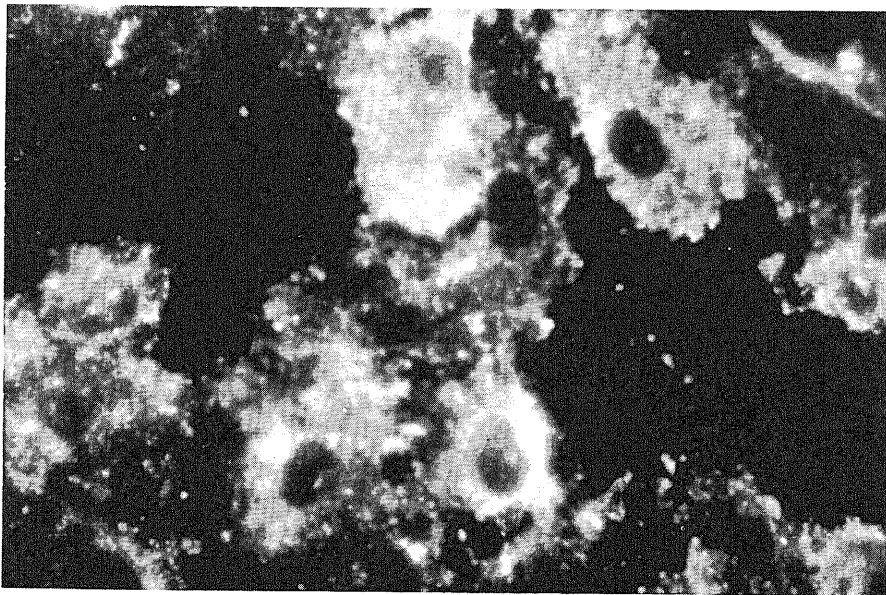


写真4 HBsAg on cytoplasm of KN cells after treatment with HBsAg positive sera demonstrated by immunofluorescence.